

048  
10/03 04/01401  
**BUNDEREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 10 MAY 2004

WI. O

FCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:**

103 02 421.2

**Anmeldetag:**

21. Januar 2003

**Anmelder/Inhaber:**

Ribopharma AG, Kulmbach/DE

**Bezeichnung:**

Doppelsträngige Ribonukleinsäure mit verbesserter  
Wirksamkeit

**IPC:**

A 61 K, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. Mai 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Dzierzon

# Doppelsträngige Ribonukleinsäure mit verbesserter Wirksamkeit

Die Erfindung betrifft eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) mit einem zu einem Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Strang, ein Verfahren zur Herstellung sowie eine Verwendung dieser dsRNA und ein Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens.

Aus Manoharan, M. , Antisense & Nucleic Acid Drug Development 2002, 12, Seiten 103 bis 128 sind Antisinn-Oligonukleotide bekannt, deren Konjugation mit lipophilen Molekülen die zelluläre Assoziation der Antisinn-Oligonukleotide verbessert. Die zelluläre Assoziation führt zur Endocytose, bei der die aufgenommenen Antisinn-Oligonukleotide über Endosomen und Lysosomen ins Cytoplasma gelangen.

Aus Bijsterbosch, M. K. et al., Nucleic Acids Research (2000), Vol. 28, Nr. 14, Seiten 2717 bis 2725 ist es bekannt, Phosphorothioat-Antisinn-Oligodesoxinukleotide in ihrer Wirksamkeit durch Konjugation mit Cholesterin zu verbessern. Für die verbesserte Antisinn-Wirkung werden Wechselwirkungen mit Rezeptoren und Plasma-Proteinen verantwortlich gemacht.

Nachteilig bei den auf Antisinn-Technik beruhenden Verfahren ist, dass die Hemmung einer Genexpression mittels Antisinn-Oligonukleotiden bzw. -Oligodesoxinukleotiden nicht besonders effizient ist.

Wirksamer ist die Hemmung der Expression eines Zielgens mittels RNA-Interferenz. Unter RNA-Interferenz wird die gezielte Hemmung der Expression eines Gens durch doppelsträngige RNA (dsRNA) verstanden. Eine dazu geeignete dsRNA mit einem zu dem Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Strang ist aus der WO 00/44895 bekannt. In der WO 00/44895 ist außerdem ein Verfahren zur Hemmung der Expression des Zielgens

in eine Zelle beschrieben, bei dem die dsRNA in die Zelle eingeführt wird.

5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine dsRNA bereitzustellen, die eine noch bessere Wirksamkeit aufweist. Weiterhin soll ein Verfahren zur Herstellung eines solchen dsRNA, deren Verwendung sowie ein diese dsRNA enthaltendes Medikament bereitgestellt werden.

10 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 11, 16 und 20 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 10, 12 bis 15, 17 bis 19 und 21 bis 23.

15 Erfindungsgemäß ist eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) mit einem zu einem Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Strang S1 vorgesehen, wobei an der dsRNA mindestens eine lipophile Gruppe gebunden ist. Die lipophile Gruppe kann dabei aromatischen, aliphatischen oder alicyclischen Charakter aufweisen. Sie kann kovalent an der dsRNA gebunden sein. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder 20 zwei Ribonukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide der dsRNA müssen Watson-Crick-Basenpaarungen aufweisen. Insbesondere einzelne nicht zueinander komplementäre Basenpaare in der dsRNA beeinträchtigen die Wirksamkeit der dsRNA kaum oder gar nicht. Die dsRNA kann einen weiteren zum Strang S1 zumindest weit gehend komplementären Strang S2 aufweisen. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenen Strang, sofern 30 die dsRNA aus zwei Strängen besteht. Unter dem "Zielgen" wird im Allgemeinen der Abschnitt eines DNA-Strangs der doppelsträngigen DNA in der Zelle verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription des Zielgens als Matrize dienenden Abschnitt des anderen DNA-Strangs der doppelsträngigen 35

DNA einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Bei dem Zielgen handelt es sich also im Allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression des Zielgens gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein. Im Falle eines (+)-Strang-RNA-Virus, wie z.B. dem Hepatitis-C-Virus (HCV), ist das Zielgen ein Teil des kodierenden RNA-Strangs des Virus.

10 Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass durch eine Konjugation der dsRNA mit einer lipophilen Gruppe die Effizienz der durch die dsRNA vermittelten RNA-Interferenz erhöht wird. Das ist erstaunlich, weil der der RNA-Interferenz zu Grunde liegende intrazelluläre Mechanismus ein völlig anderer ist als derjenige, welcher der Hemmung der Expression nach dem Antisinn-Prinzip zu Grunde liegt. Es ist daher nicht anzunehmen, dass dieselben Plasma-Proteine mit der erfindungsgemäßen dsRNA wechselwirken und deren Wirkung verbessern, welche auch mit Cholesterin-konjugierten Phosphorothioat-Antisinn-  
20 Oligodesoxinukleotide wechselwirken.

Möglicherweise basiert die bessere Wirksamkeit der mit lipophilen Molekülen konjugierten Antisinn-Oligonukleotide oder Cholesterin-konjugierten Phosphorothioat-Oligodesoxinukleotide auf deren verbesserter Aufnahme in Zellen durch Rezeptoren oder zelluläre Assoziation. Obwohl die erfindungsgemäße dsRNA auch ohne ein zusätzliches Transfektionshilfsmittel von Zellen aufgenommen werden kann, muss der der verbesserten Wirksamkeit zu Grunde liegende Mechanismus ein anderer sein.  
30 Es zeigte sich nämlich, dass die erfindungsgemäße dsRNA die verbesserte Wirksamkeit auch dann aufweist, wenn sie mittels eines Transfektionshilfsmittels, wie FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim, Deutschland) in Zellen eingeschleust wird. Eine

verbesserte Aufnahme in die Zellen durch zelluläre Assoziation oder Rezeptoren kann dafür nicht verantwortlich sein.

Vorzugsweise ist die lipophile Gruppe nur am Strang S1 oder nur an dem weiteren dazu zumindest weit gehend komplementären Strang S2 der dsRNA, insbesondere kovalent, gebunden. Erstaunlicherweise wird auch der keine lipophile Gruppe aufweisende Strang der dsRNA gut zusammen mit dem die lipophile Gruppe aufweisenden Strang der dsRNA von Zellen aufgenommen.

Als vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn die lipophile Gruppe am 5'-Ende des Strangs S1 und/oder des Strangs S2, insbesondere kovalent, gebunden ist. Eine solche dsRNA ist einfach im Wege einer Festphasensynthese herzustellen und weist eine gute Wirksamkeit auf. Die Wirkung einer solchen dsRNA kann weiter gesteigert werden, indem die lipophile Gruppe ausschließlich am 5'-Ende des Strangs S2 gebunden ist.

Die dsRNA zeigt eine gute Wirksamkeit, wenn die lipophile Gruppe die Struktur eines Steroids, insbesondere eines Sterols, vorzugsweise von Cholesterin oder eines, insbesondere verzweigten, aliphatischen Kohlenwasserstoffs aufweist. Die lipophile Gruppe kann die Struktur von (6-Hydroxy-hexyl)-carbamidsäure-cholesterylester oder 12-Hydroxy-dodecansäure-bis-decylamid aufweisen.

Noch weiter gesteigert werden kann die Wirksamkeit der dsRNA, wenn diese an ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden Ende einen aus 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2, Nukleotiden am Strang S1 gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Das andere Ende der dsRNA kann ohne Überhang, das heißt glatt ausgebildet sein. Zur Verstärkung der Interferenz-Wirkung der dsRNA ist ein Überhang an einem Ende der dsRNA ausreichend. Die Stabilität der dsRNA wird dadurch nicht in einem solchen Maße erniedrigt wie durch zwei Überhänge. Eine dsRNA mit nur

einem Überhang hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut, Serum und Zellen als hinreichend beständig und besonders Wirksam erwiesen.

- 5 Bevorzugt weist der Strang S1 der dsRNA weniger als 30, insbesondere weniger als 25, Nukleotide auf. Die Zahl der Nukleotide des Strangs S1 sollte mindestens 17 betragen. Vorzugsweise weist der Strang S1 21 bis 24 Nukleotide auf. Eine solch kurze auch als siRNA (short interfering RNA) bezeichnete dsRNA hat sich intrazellulär als besonders beständig erwiesen. Bevorzugt weist der Strang S2 maximal dieselbe Zahl an Nukleotiden auf. Das Zielgen kann ein, insbesondere spezifisch, in Leberzellen oder Zellen des Pankreas, der Gebärmutter oder der Harnblase exprimiertes Zielgen sein. Bei den Le-
- 10 berzellen handelt es sich insbesondere um endotheliale Zellen, Kupffer-Zellen oder parenchymale Zellen. Bei solchen Leberzellen ist die erfindungsgemäße dsRNA besonders wirksam, weil sie besonders effizient von diesen Zellen aufgenommen wird. Dies gilt insbesondere dann, wenn die lipophile Gruppe ein Grundgerüst von Cholesterin aufweist. Eine gute Aufnahme der erfindungsgemäßen dsRNA findet aber auch bei Zellen anderer Gewebe, wie Pankreas, Harnblase und Gebärmutter, insbesondere Zervix, statt. Besonders gut geeignet ist die erfindungsgemäße dsRNA zur Behandlung einer Infektion mit dem Le-
- 15 berzellen befallenden HCV-Virus. Dazu stammt das Zielgen aus dem HCV-Genom, insbesondere der am 3'-Ende des HCV-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR).
- 20

- Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen dsRNA, wobei die den Strang S1 und/oder den Strang S2 bildende RNA mittels Festphasensynthese in Richtung vom 3'- zum 5'- Ende hergestellt wird und dabei ein eine Phosphoramidit-Gruppe aufweisendes lipophiles Molekül beim letzten Syntheszyklus an das 5'-Ende der RNA
- 30 gekoppelt wird. Bei der in aufeinanderfolgenden Syntheszy-
- 35

klen erfolgenden Festphasensynthese einer RNA liegen die Nukleotide zunächst als Nukleosid-Phosphoramidite vor. In jedem Synthesesyklus wird jeweils an der 5'-OH-Gruppe des zuletzt eingebauten Nukleotids ein weiteres Nukleosid-Phosphoramidit gebunden. Weist das lipophile Molekül eine Phosphoramidit-Gruppe auf, so kann sie wie ein Nukleosid-Phosphoramidit bei der Festphasensynthese an das freie 5'-OH-Ende der zuvor synthetisierten RNA gekoppelt werden. Dadurch wird die Synthese einer eine lipophile Gruppe aufweisenden dsRNA deutlich vereinfacht. Die Synthese kann automatisiert und standardisiert in einem herkömmlichen RNA-Synthesizer erfolgen. Die Synthese des die Phosphoramidit-Gruppe aufweisenden lipophilen Moleküls kann die Phosphitylierung einer freien OH-Gruppe zur Phosphoramidit-Gruppe umfassen. Dadurch kann die Phosphoramidit-Gruppe besonders einfach bereitgestellt werden. Die Synthese des die Phosphoramidit-Gruppe aufweisenden lipophilen Moleküls kann das Überführen von Cholesteryl-chlorformiat in ein Säureamid oder das Umsetzen von 12-Hydroxylaurinsäure mit Di-n-decylamin unter Bildung einer Säureamidbindung umfassen. Bei dem die Phosphoramidit-Gruppe aufweisenden lipophilen Molekül kann es sich um [6-(2-cyanoethoxy)-N,N-diisopropylamino-phosphanyloxy]-carbamidsäure-cholesteryl-ester oder 12-[(2-cyanoethoxy)-N,N-diisopropylamino-phosphanyloxy]-dodecansäure-bis-decylamid handeln.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer erfindungsgemäßen dsRNA zur Hemmung der Expression eines in Zellen enthaltenen Zielgens. Dies kann in vitro oder in vivo erfolgen. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung, wenn dabei kein Agens verwendet wird, durch welches die Aufnahme der dsRNA in die Zellen vermittelt wird. Dadurch können durch ein solches Agens bewirkte Nebenwirkungen vermieden werden. Ein solches Agens ist beispielsweise ein Transfektionshilfsmittel, wie FuGENE 6 Transfection Reagent, welches von der Firma Roche Diagnostics GmbH vertiebt wird. Dieses Agens ist in

vivo jedoch nicht einsetzbar. Vorzugsweise wird die Expression des Zielgens in, insbesondere mit dem HCV-Virus infizierten, Leberzellen oder Zellen des Pankreas, der Gebärmutter oder der Harnblase gehemmt. Das Zielgen kann aus dem HCV-Genom, insbesondere der am 3'-Ende des HCV-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR), stammen.

Die Erfindung betrifft auch ein die erfindungsgemäße dsRNA enthaltendes Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens. Bevorzugt ist in dem Medikament kein Agens enthalten, durch welches die Aufnahme der dsRNA in die Zellen vermittelt wird. Bei den Zellen kann es sich um, insbesondere mit dem HCV-Virus infizierte, Leberzellen oder Zellen des Pankreas, der Gebärmutter oder der Harnblase handeln. Das Zielgen kann aus dem HCV-Genom stammen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beispielhaft erläutert. Es zeigen

20 Fig. 1 eine schematische Darstellung eines Synthesewegs für die Herstellung von "Chol",

Fig. 2 eine schematische Darstellung eines Synthesewegs für die Herstellung von "C32",

Fig. 3 die relative  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in  $\beta$ -Gal $\oplus$ HuH-7 Zellen nach Transfektion mit dsRNA,

Fig. 4 die relative  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in  $\beta$ -Gal $\oplus$ HuH-7 Zellen nach Transfektion mit dsRNA ohne Verwendung eines Transfektionshilfsmittels und einen Northern-Blot der nach der Transfektion aus den Zellen isolierten dsRNA und



Fig. 5a, b, c je einen Northern-Blot von dsRNA, welche nach einer Transfektion von Zellen des Pankreas, der Gebärmutter und der Harnblase ohne Verwendung eines Transfektionshilfsmittels aus diesen Zellen isoliert worden ist.

#### Synthese des Cholesterinderivats "Chol":

Der Syntheseweg für die Darstellung von Chol ist schematisch in Fig. 1 dargestellt.

Zur Synthese wurde Cholesteryl-chlorformiat 8 wie folgt durch Zugabe von 1,2 Äquivalenten 6-Aminohexanol in Gegenwart von  $\text{NaHCO}_3$  ins Säureamid (6-Hydroxy-hexyl)-carbamidsäure-cholesterylester 9 überführt:

2 g (4,45 mmol) Cholesteryl-chloroformiat 8 wurden in 10 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und mit 561 mg (6,68 mmol)  $\text{NaHCO}_3$  versetzt. Unter starkem Rühren wurden anschließend bei  $0^\circ\text{C}$  626 mg (5,34 mmol) 6-Aminohexanol, gelöst in 10 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , zugegeben. Die Tropfgeschwindigkeit betrug dabei ca. 1 Tropfen/s. Die Reaktion lief über 16 h, wobei sich die Temperatur langsam auf Raumtemperatur erhöhte. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 30 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  verdünnt, mit  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, abfiltriert und eingeeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt. Dazu wurde eine 15 cm hoch mit Kieselgel, Korngröße 40-63  $\mu\text{m}$  (Merck KGaA, Frankfurt Str. 250, Darmstadt, Deutschland) gefüllte Säule mit 4,5 cm Durchmesser verwendet. Als Flußmittel diente Cyclohexan/Essigester 2:1.

Die freie OH-Gruppe des resultierenden Produkts 9 wurde wie folgt phosphityliert, d.h. in eine Phosphoramidit-Gruppe überführt:

- 5 Es wurden 500 mg (0,944 mmol) des Edukts 9 in 15 ml wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und im Argon-Gegenstrom in einen vorher evakuierten und mit Argon belüfteten Kolben gefüllt. Unter Rühren wurden anschließend 485  $\mu\text{l}$  (2,83 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) und tropfenweise 261  $\mu\text{l}$  (1,04 mmol) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorophosphoramidit hinzugefügt und die
- 10 Reaktionsmischung im Argonstrom bei Raumtemperatur gerührt. Nach 90 min war die Umsetzung beendet. Die Reaktionsmischung wurde zunächst mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  verdünnt und dann mit gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Schließlich wurde die wässrige Phase
- 15 mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  rückextrahiert. Sodann wurden die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, abfiltriert und mittels eines mit Argon belüfteten Rotationsverdampfers eingedunstet. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie mit Argondruck gereinigt. Dazu wurde eine 8 cm hoch mit Kieselgel, Korngröße 40-63  $\mu\text{m}$  (Merck KGaA) gefüllte Säule mit 4,5 cm Durchmesser verwendet. Als Flußmittel diente Cyclohexan/Essigester 6:1 + 1% Triethylamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ ). Das dabei verwendete Kieselgel wurde zuvor für 2 Stunden mit Cyclohexan/1%  $\text{Et}_3\text{N}$  aufgeschlämmt. Als Produkt wurde der hier als "Chol" bezeichnete [6-(2-cyanoethoxy)-*N,N*-diisopropylamino-phosphanyloxy]-carbamidsäure-cholesterylester 10 erhalten.

Synthese des Di-*n*-decylaminderivats "C32":

- 30 Der Syntheseweg für die Darstellung von C32 ist schematisch in Fig. 2 dargestellt.

Zur Synthese wurde 12-Hydroxylaurinsäure 11 wie folgt mit 2 Äquivalenten des sekundären Amins Di-*n*-decylamin 15 zum Produkt 12-Hydroxy-dodecansäure-bis-decylamid 16 umgesetzt:

1g (4,623 mmol) 12-Hydroxylaurinsäure 11 wurde mit 282 mg  
(2,31 mmol) *p*-*N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 1,329 g  
(6,94 mmol) *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimid-  
5 hydrochlorid (EDCI) zur Reaktion gebracht. Anschließend wur-  
den 2,751 g (9,246 mmol) Di-*n*-decylamin 15 zugegeben und die  
Reaktionsmischung bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Nach 16  
h wurde das Rohprodukt mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verdünnt und zweimal mit H<sub>2</sub>O  
extrahiert, wobei sich in der wässrigen Phase ein flockiger  
10 weißer Feststoff bildete. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
rückextrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen  
mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, abfiltriert und eingeeengt. Das auf die-  
se Weise gewonnene Rohprodukt wurde mittels Säulen-  
chromatographie gereinigt. Dazu wurde eine 19 cm hoch mit  
15 Kieselgel, Korngröße 40-63 µm (Merck KgaA) gefüllte Säule mit  
4,5 cm Durchmesser verwendet. Als Flußmittel diente Cyclo-  
hexan/Essigester 4:1.

Die freie OH-Gruppe des resultierenden Produkts 16 wurde wie  
20 folgt phosphityliert:

Es wurden 1,018 g (2,05 mmol) des Säureamids 16 in 30 ml was-  
serfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und im Argon-Gegenstrom in einen vor-  
her evakuierten und mit Argon belüfteten Kolben gefüllt. Un-  
25 ter Rühren wurden anschließend 1054 µl (6,16 mmol) DIPEA und  
tropfenweise 504 µl (2,26 mmol) 2-Cyanoethyldiisopropyl-  
chlorophosphoramidit hinzugefügt und die Reaktionsmischung im  
Argonstrom bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 h war die Um-  
setzung beendet. Die Reaktionsmischung wurde zunächst mit  
30 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verdünnt und dann mit gesättigter NaCl-Lösung extra-  
hiiert. Schließlich wurde die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> rück-  
extrahiert. Sodann wurden die vereinigten organischen Phasen  
über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, abfiltriert und mittels eines mit Ar-  
gon belüfteten Rotationsverdampfers eingeeengt. Das Rohprodukt  
35 wurde über Säulenchromatographie mit Argondruck gereinigt.

Dazu wurde eine 20 cm hoch mit Kieselgel, Korngröße 40-63  $\mu\text{m}$  (Merck KGaA) gefüllte Säule mit 4,5 cm Durchmesser verwendet. Als Flußmittel diente Cyclohexan/Essigester 8:1 + 1%  $\text{Et}_3\text{N}$ . Das verwendete Kieselgel wurde zuvor für 2 Stunden mit Cyclohexan/1%  $\text{Et}_3\text{N}$  aufgeschlämmt. Als Produkt wurde das hier als "C32" bezeichnete 12-[(2-cyanoethoxy)-N,N-diisopropylamino-phosphanyloxy]-dodecansäure-bis-decylamid 17 erhalten.

Die für die Synthesen von Chol und C32 eingesetzten Chemikalien stammten von Fluka, Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs SG, Schweiz und die für die Säulenchromatographie eingesetzten Bestandteile der Flußmittel von Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland.

#### 15 RNA-Synthese:

Als Zielsequenzen für die RNA-Interferenz wurden eine Sequenz aus der hoch konservierten 3'-UTR-Region des Hepatitis C Virus (HCV)-Gens sowie eine Sequenz aus dem  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal)-Gen aus *E. coli* gewählt. Die für Transfektionen eingesetzten doppelsträngigen Oligoribonukleotide weisen die folgenden, im Sequenzprotokoll mit Nr. 1 bis Nr. 4 bezeichneten, Sequenzen auf:

HCV: dsRNA, deren einer Strang S1 (Antisinn-Strang) zu einer Zielsequenz aus dem HCV-Gen komplementär ist:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC- 3' (HCV11s - Sequenz Nr. 2)  
S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG- 5' (HCV2 - Sequenz Nr. 1)

Gal: dsRNA, deren einer Strang S1 (Antisinn-Strang) zu einer Zielsequenz aus dem  $\beta$ -Galaktosidase-Gen komplementär ist:

S2: 5'- GUG AAA UUA UCG AUG AGC GUG- 3' (Gal3s - Sequenz Nr. 4)  
S1: 3'-GC CAC UUU AAU AGC UAC UCG CAC- 5' (Gal2 - Sequenz Nr. 3)

Als Negativkontrolle wurde eine als K22 bezeichnete dsRNA verwendet, die keinen Bezug zu einem hier exprimierten Gen aufweist. Die Sequenzen der beiden die dsRNA K22 bildenden Oligoribonukleotide sind als Sequenzen Nr. 5 und 6 im Sequenzprotokolls enthalten.

Die RNA-Einzelstränge wurden mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher Festphasensynthese unter Verwendung von Ribonukleosid-Phosphoramiditen (ChemGenes Corporation, Ashland Technology Center, 200 Homer Avenue, Ashland, MA 01721, USA) hergestellt. An jeden der RNA-Einzelstränge konnte eine lipophile Gruppe gebunden werden. Dazu wurden die Amidite [6-(2-cyanoethoxy)-N,N-diisopropylamino-phosphanyloxy]-carbamidsäure-cholesterylester 10 oder 12-[(2-cyanoethoxy)-N,N-diisopropylamino-phosphanyloxy]-dodecansäure-bis-decylamid 17 jeweils am Ende der Festphasensynthese analog zu den Ribonukleosid-Phosphoramiditen an das 5'-OH-Ende der synthetisierten RNA gekoppelt.

RNA-Einzelstränge mit und ohne lipophile Gruppe wurden mittels HPLC aufgereinigt. Als Säulen wurden NucleoPac PA-100, 9x250 mm der Fa. Dionex GmbH, Am Wörtzgarten 10, 65510 Idstein, Deutschland, verwendet; eingesetzter Niedrigsalz-Puffer: 20 mM Tris, 10 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 6 M Harnstoff; eingesetzter Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 6 M Harnstoff. Der Fluss betrug 3 ml/Minute. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

Es wurden die folgenden mit lipophilen Gruppen modifizierten dsRNAs bzw. siRNAs synthetisiert:

5 Gal mit der lipophilen Gruppe Chol am Strang S1: GalChol-as

Gal mit der lipophilen Gruppe Chol am Strang S2: GalChol-s

Gal mit der lipophilen Gruppe Chol jeweils am Strang S1 und am Strang S2: GalChol-2

10

Gal mit der lipophilen Gruppe C32 am Strang S1: GalC32-as

Gal mit der lipophilen Gruppe C32 am Strang S2: GalC32-s

15 Gal mit der lipophilen Gruppe C32 jeweils am Strang S1 und am Strang S2: GalC32-2

HCV mit der lipophilen Gruppe Chol am Strang S1: HCVChol-as

20 HCV mit der lipophilen Gruppe Chol am Strang S2: HCVChol-s

HCV mit der lipophilen Gruppe Chol jeweils am Strang S1 und am Strang S2: HCVChol-2

25 HCV mit der lipophilen Gruppe C32 am Strang S1: HCVC32-as

HCV mit der lipophilen Gruppe C32 am Strang S2: HCVC32-s

30 HCV mit der lipophilen Gruppe C32 jeweils am Strang S1 und am Strang S2: HCVC32-2

35 Der Effekt der RNA-Interferenz auf virale Gensequenzen ist an Hand eines nicht-pathogenen Ersatzsystems untersucht worden. Dazu wurde ein Oligonukleotid gemäß der Sequenz Nr. 7 des Sequenzprotokolls vor ein für E. coli- $\beta$ -Galaktosidase kodieren-

des Gen aus dem kommerziell erhältlichen Expressionsvektor p $\beta$ Gal-Control (BD Biosciences Clontech, Tullastrasse 4, D-69126 Heidelberg, Deutschland, Gene Accession Number U13186; Nukleotid 280-3429) kloniert. Die Sequenz Nr. 7 entspricht einer 24 Nukleotide umfassenden Sequenz aus einem hochkonservierten Bereich der 3'-UTR des HCV-Genoms. Das so generierte Fusionsgen wurden in das kommerziell erhältliche Expressionsplasmid pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, Life Technologies, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether-Str. 10, D-76131 Karlsruhe, Deutschland, Katalognummer V790-20) kloniert, welches ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Neomycin enthält. Das resultierende Plasmid wurde als p3 bezeichnet. In p3 ist die HCV-Sequenz gemäß Sequenz Nr. 7 nicht Teil des offenen Leserahmens der für  $\beta$ -Galaktosidase kodierenden Sequenz, so dass die HCV-Sequenz zwar als Teil einer für  $\beta$ -Galaktosidase kodierenden mRNA transkribiert aber nicht als Teil eines Fusionsproteins exprimiert wird. Die den 24 Nukleotiden entsprechende Sequenz der mRNA ist dann identisch mit der entsprechenden Sequenz des HCV-Genoms. Das Plasmid p3 weist den folgenden relevanten Sequenzabschnitt gemäß Sequenz Nr. 8 des Sequenzprotokolls auf:

GTC ACC TTG TCG TCA CGG CTA GCT GTG AAA GGT CCA GTC ACC ATG TCG TTT ACT TTG  
M S F T L

Die N-terminale Aminosäuresequenz des Fusionsproteins HCV- $\beta$ -Galaktosidase ist unter der DNA-Sequenz aufgeführt. Die HCV-Sequenz ist kursiv dargestellt. Der Beginn des  $\beta$ -Gal-Gens (einschließlich 6 Nukleotide der Kozak-Sequenz vor dem Codon ATG) ist unterstrichen.

Alle Experimente zur Untersuchung der posttranskriptionellen Hemmung der Genexpression durch RNA-Interferenz wurden mit Zellen der von HuH-7-Zellen (JCRB0403, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, National Institute of Health

Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan) abgeleiteten Zelllinie  $\beta$ -Gal $\oplus$ HuH-7 durchgeführt. Bei HuH-7 handelt es sich um eine humane Hepatom-Zelllinie. Die HuH-7-Zellen wurden mit p3 transfiziert. Die transfizierten HuH-7-Zellen weisen eine Resistenz gegen das Neomycin-Analogon G418 auf, so dass in Gegenwart von G418 nur HuH-7-Zellen selektiert werden, welche das Plasmidgenom und damit das Reportergen stabil in ihr Genom aufgenommen haben. Diese Zellen werden hier als  $\beta$ -Gal $\oplus$ HuH-7 bezeichnet.

Für die Zellkultur und die Experimente sind die folgenden Medien und Lösungen verwendet worden:

- Dulbecco's MEM (BIOCHROM AG, Leonorenstr. 2-6, D-12247 Berlin, Deutschland) mit 10% (v/v) Fötalem Kälberserum (FCS) und 350  $\mu$ g/ml L-Glutamin, im Folgenden als "Medium" bezeichnet,
- Dulbecco's MEM ohne FCS, im Folgenden als "Serumfreies Medium" (SFM) bezeichnet und
- Phosphat-gepufferte Salzlösung, bestehend aus 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$  und 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,3, steril filtriert, im Folgenden als "PBS" bezeichnet.

Die Zellen wurden in 10 ml Medium bei 37°C und 5%-iger  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre in 75  $\text{cm}^2$  Zellkultur-Flaschen (Corning B.V, Life Sciences, Koolhovenlaan 12, 1119 NE Schiphol-Rijk, Niederlande) kultiviert.

#### Transfektionsexperimente:

Transfektionsexperimente wurden mit  $\beta$ -Gal $\oplus$ HuH-7-Zellen, humanen Zervixkarzinom-Zellen (Zelllinie HELA-S3, zu beziehen von der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und



Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland, Nummer ACC 161), humanen Harnblasenkarzinom-Zellen (Zelllinie T-24, zu beziehen von der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Nummer ACC 376) und Zellen einer aus einem humanen Pankreaskarzinom kultivierten Zelllinie durchgeführt. Mit Hilfe eines Biolumineszenz-Assays wurde die Aktivität des Reportergens  $\beta$ -Galaktosidase in den  $\beta$ -Gal $\oplus$ Huh-7-Zellen bestimmt und damit eine Aussage über die Inhibitionseffizienz der siRNA ermöglicht.

Transfektionen erfolgten 24 h nach dem Aussäen der Zellen in 96-Well-Platten (Zellzahl am Aussätag:  $2 \cdot 10^4$  pro Well) bzw. 12-Well-Platten (Zellzahl am Aussätag:  $1-2 \cdot 10^5$  pro Well). Die Transfektion der Zellen erfolgte entweder mittels FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics GmbH) oder ohne Transfektionshilfsmittel.

#### Transfektion von $\beta$ -Gal $\oplus$ Huh-7-Zellen mit FuGENE 6:

Transfektionen wurden in 96-Well-Platten (5-fach Bestimmung) mit einer siRNA-Konzentration von 50 nM pro Well durchgeführt. Die Transfektionsansätze, welche zu den Zellen hinzupipettiert wurden, hatten ein Volumen von 100  $\mu$ l/5 Wells. Die Transfektionsansätze bestanden aus einer der zu testenden Konzentration entsprechenden Menge an siRNA, 3  $\mu$ l FuGENE 6 pro 1  $\mu$ g RNA und SFM, mit welchem sie auf 100  $\mu$ l aufgefüllt wurden. Bei der Durchführung der Transfektion wurde zunächst die siRNA in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt, mit SFM vermischt und sodann mit FuGENE 6 versetzt. Diese Mischung wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann in die Wells pipettiert und die Zellen für 48 h bei 37°C und 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

Transfektion von  $\beta$ -Gal $\oplus$ Huh-7-, Zervixkarzinom-, Harnblasenkarzinom- und Pankreaskarzinom-Zellen ohne Transfektionshilfsmittel:

Transfektionen wurde in 12-Well-Platten in 3-fach-Ansätzen durchgeführt. Es wurde eine Konzentration von 100 nM siRNA pro Well verwendet. Für einen Transfektionsansatz wurden 6  $\mu$ l einer 20  $\mu$ M siRNA mit 1194  $\mu$ l SFM gemischt. Dann wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 400  $\mu$ l des Transfektionsansatzes pro Well ersetzt. Nach Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 2½ h wurde der Transfektionsansatz abpipetiert, durch 1 ml Medium ersetzt und die Zellen weitere 24 h inkubiert.

Zelllyse und Biolumineszenz-Assay:

Die Zelllyse wurde 24 oder 48 h nach der Transfektion in den 96- bzw. 12-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen je zweimal mit 100  $\mu$ l bzw. 500  $\mu$ l PBS gewaschen. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur 10 min mit 50  $\mu$ l bzw. 250  $\mu$ l Lysis-Lösung (0,5 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) und Proteaseinhibitor (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets 50x, Roche Diagnostics GmbH, Bestell-Nr. 1 697 498) in vom Hersteller empfohlener Konzentration in Lysis-Solution (Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 USA, Bestell-Nr. ABX070LM) überschichtet und schließlich mit einer Pipette gründlich resuspendiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäße auf Eis überführt. Dann erfolgten 10-15 s Vortexen und 2 min Zentrifugation bei 16100 g. Der Überstand wurde entweder sofort für den Assay verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität erfolgte in 5ml-Hämolyseröhrchen (Sarstedt AG & Co., Postfach 1220, D-51582 Nümbrecht, Deutschland, Bestell-Nr. 55.476) an einem Sirius Luminometer (Berthold Detection Systems GmbH, Bleichstr. 56-68, D-75173 Pforzheim, Deutschland). Für die Messung der  $\beta$ -

Galaktosidaseaktivität wurden 5  $\mu$ l Zelllysats mit 30  $\mu$ l  $\beta$ -Gal-  
Assay-Puffer (100 mM Na-Phosphat, pH 8,0, 10 mM  $MgCl_2$ , 12,5  
 $\mu$ g/ml Galacton (Applied Biosystems, Bestell-Nr. GC020)) in  
einem Hämolyseröhrchen gemischt und 1 h bei Raumtemperatur  
5 inkubiert. Dann wurden 100  $\mu$ l  $\beta$ -Gal-Stopp-Mix (200 mM NaOH,  
0,06% Emerald Enhancer II (Applied Biosystems, Bestell-Nr.  
LAY250)) zugegeben, kurz gemischt und sofort die Lumineszenz  
am Luminometer gemessen.

#### 10 siRNA-Isolierung aus Zellen:

24 h nach der Transfektion in einer 12-Well-Platte wurde die  
Gesamt-RNA und die siRNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (QIA-  
GEN GmbH, Max-Volmer-Straße 4, 40724 Hilden, Deutschland) aus  
den Zelllysaten isoliert. Die Isolierung wurde gemäß dem Pro-  
15 tokoll "Isolation of total RNA from animal cells" der Firma  
QIAGEN mit der folgenden Modifikation durchgeführt: Nach dem  
ersten Zentrifugationsschritt wurde der Säulendurchfluß bis  
zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ C$  aufbewahrt, da sich in die-  
sem die kurze siRNA befand.

#### 20 Nachweis von siRNA mittels Northern Blot:

Da die Konzentration an siRNA im Durchfluß nicht direkt er-  
mittelt werden konnte, wurde sie in Relation zur Konzentration  
an Gesamt-RNA bestimmt. Es wurden jeweils gleiche Mengen  
an siRNA aus den Durchflüssen der einzelnen Proben einge-  
setzt. Gleiche siRNA-Mengen entsprechende Volumina an Durch-  
fluß wurden mit RLT-Puffer (aus dem RNeasy-Mini-Kit)/70%  
Ethanol 1:1 auf gleiche Volumina aufgefüllt, mit 5  $\mu$ l E. coli  
tRNA (Roche Diagnostics GmbH, Bestell-Nr. 109541) (10  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
30 versetzt. Die siRNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M  
Natriumacetat ( $NaOAc$ ), pH 5,4 sowie 3 Volumina absolutem  
Ethanol (EtOH) für 16 h bei  $-20^\circ C$  gefällt. Die siRNA wurde  
durch 10 min Zentrifugation bei 16100 g pelletiert, die Pel-  
lets mit 700  $\mu$ l 70% EtOH gewaschen und nochmals 5 min bei  
35 gleicher g-Zahl zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands

wurden die resultierenden siRNA-Proben in 10 µl Stopp-Puffer (95% (v/v) Formamid, 0,1% (w/v) Xylencyanol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau und 10 mM Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz) resuspendiert, durch 5 min Inkubation bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und auf ein 18%-iges, denaturierendes Sequenziergel (10 x 10 x 0,8 cm, 14,5 ml Sequenziergel-Konzentrat, 2 ml Puffer-Konzentrat, 3,5 ml Sequenziergel-Verdünner, jeweils aus dem Rotiphorese DNA Sequenziersystem A431.1 (Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstr. 1 - 5, D-76185 Karlsruhe) 20 µl *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Carl Roth GmbH & Co., Bestell-Nr. 2367.3) und 60 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (Carl Roth GmbH & Co., Bestell-Nr. 9592.3) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für 2-3 h bei 150 V mit 1x Tris-Borsäure-EDTA (TBE) (10,8 g TRIS, 5,5 g Borsäure, 4 ml 0,5M EDTA, pH 8,0) als Laufpuffer. Anschließend wurden die RNA mittels der *semi-dry* Methode in einer Hoefer semi-Dry Transfer Unit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Munziger Str. 9, D-79111 Freiburg, Deutschland, Bestell-Nr. 80-621-86) elektrophoretisch (2 h bei 100 mA) auf eine Hybond N<sup>+</sup>-Membran (Amersham Biosciences Europe GmbH, Bestell-Nr. RPN203B) transferiert. Danach wurde die Membran 16 h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend 3 h bei 80°C gebacken.

#### Herstellung der radioaktiv markierten Sonden:

Als Sonden für die Detektion der siRNA wurden die Einzelstrang-RNAs Gal3s (Sequenz-Nr. 3) und HCV11s (Sequenz-Nr. 2) eingesetzt und dazu an den 5'-Enden mittels T4 Polynukleotidkinase (PNK) radioaktiv markiert. Dazu wurden 3 µl RNA (20 µM) mit 5 µl γ-[<sup>32</sup>P]-ATP (10 µCi/µl), 35 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl PNK 10x Puffer und 1 µl PNK (10 U/µl) (PNK 10x Puffer und PNK von New England Biolabs, Brüningstr. 50, Geb. G810, D-65926 Frankfurt am Main, Deutschland, Bestell-Nr. M0201S) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und die Sonden mittels einer MicroSpin™-25 Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH) ge-

reinholt. Dazu wurde die Reaktionsmischung auf die kurz gevor-  
texten und 1 min bei 0,7 g trocken zentrifugierten Säulen auf-  
getragen und die Sonde durch nochmalige Zentrifugation für 1  
min bei 0,7 g eluiert.

5

Hybridisierung: Für die Hybridisierungsreaktion wurde die Ex-  
pressHyb™ Hybridisation Solution (BD Biosciences Clontech,  
Tullastr. 4, D-69126 Heidelberg, Deutschland) verwendet. Zu-  
erst wurde die Membran mit der siRNA kurz in H<sub>2</sub>O angefeuchtet  
und auf einem Schüttler 30 min bei 37°C mit 5 ml ExpressHyb  
Hybridisation Solution prähybridisiert. Danach wurde die Ex-  
pressHyb Hybridisation Solution durch eine Mischung aus 5 ml  
ExpressHyb Hybridisation Solution und 250 ng der radioaktiv  
markierten Sonde ersetzt und der Blot 1 h bei 37°C hybrid-  
siert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschrirte bei Raum-  
temperatur, zunächst mit Waschlösung 1 (0,3 M NaCl, 30 mM Na-  
triumcitrat, pH7,0, 0,05% Natriumdodecylsulfat (SDS)), welche  
innerhalb von 45 min dreimal gewechselt wurde, danach 45 min  
mit Waschlösung 2 (15 mM NaCl, 1,5 mM Natriumcitrat, pH7,0,  
0,1% SDS) unter zweimaligem Austausch der Lösung. Zur Ent-  
wicklung wurde die Membran auf Filterpapier gelegt, mit  
Frischhaltefolie umwickelt und 16 h in einer Kassette auf ei-  
ner Storage Phosphor Screen (Amersham Biosciences Europe  
GmbH) exponiert. Diese wurde schließlich mit Hilfe eines  
Storm 820 Phosphorimagers (Amersham Biosciences Europe GmbH,  
Bestell-Nr. 63-0035-52) ausgelesen.

#### Ergebnisse:

Alle Experimente zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität  
wurden 5-fache ausgeführt und ein Mittelwert der gemessenen  
Werte gebildet. Die Ergebnisse der durch die Transfektionen  
bewirkten Änderungen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität sind gra-  
fisch in Fig. 3 dargestellt. Der Mittelwert unbehandelter  
Zellen ist als 1,0 definiert worden. Die für transfizierte  
Zellen ermittelten Werte sind im Verhältnis dazu dargestellt.

Es zeigte sich, dass durch die modifizierten siRNAs die Genexpression auf bis zu 56% im Falle von GalChol-s herabgesetzt werden konnte.

- 5 Das Ergebnis der ohne Transfektionshilfsmittel mit  $\beta$ -Gal $\oplus$ Huh-7-Zellen durchgeführten Transfektionsexperimente ist in Fig. 4 dargestellt. Die Inhibition der  $\beta$ -Gal-Expression ist mittels Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt worden. Die von den Zellen aufgenommene siRNA ist im Zelly-
- 10 sat mittels Northern Blot durch Hybridisierung mit den radioaktiv markierten Einzelstrang-RNA-Sonden Gal3s und HCV11s nachgewiesen worden.

- Im oberen Teil von Fig. 4 ist jeweils die  $\beta$ -Gal-Aktivität der mit den angegebenen siRNAs behandelten Zellen dargestellt. Im
- 15 unteren Teil der Abbildung ist jeweils der Northern-Blot der aus diesen Zellen isolierten siRNA gezeigt. Von links nach rechts zeigen die ersten vier Spuren des Northern-Blots die siRNA-Isolate der mit den modifizierten siRNAs HCVChol-s, HCVC32-s, GalChol-s und GalC32-s behandelten Zellen. Die fol-
- 20 genden drei Spuren zeigen siRNA-Isolate der mit den nicht-modifizierten siRNAs HCV, Gal und K22 behandelten Zellen.

- Fig. 4 zeigt, dass siRNAs mit den Modifikationen Chol-s und C32-s auch ohne den Zusatz von Transfektionshilfsmitteln von
- 25 Zellen aufgenommen werden und eine Inhibition der Expression eines Zielgens bewirken. Nicht modifizierte siRNAs werden hingegen ohne Transfektionshilfsmittel nicht von Zellen aufgenommen und hemmen die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase nicht.

- 30 In den Figuren 5a, 5b und 5c ist jeweils ein Northern Blot von aus Pankreaskarzinom- (Fig. 5a), Zervixkarzinom- (Fig. 5b) und Harnblasenkarzinom-Zellen (Fig. 5c) isolierter siRNA dargestellt. Die jeweiligen Spuren der Northern Blots zeigen von links nach rechts siRNA-Isolate aus Zellen, welche mit

folgenden siRNAs ohne Transfektionshilfsmittel behandelt wurden: HCVChol-s (Spur 1), HCVC32-s (Spur 2), GalChol-s (Spur 3), GalC32-s (Spur 4), HCV (Spur 5) und Gal (Spur 6). Die Figuren 5a, 5b und 5c zeigen, dass die erfindungsgemäße dsRNA auch von anderen Zellen als Leberzellen ohne Transfektionshilfsmittel aufgenommen wird.

## Patentansprüche

1. Doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) mit einem zu einem Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Strang S1, dadurch gekennzeichnet, dass an der dsRNA mindestens eine lipophile Gruppe gebunden ist.
2. DsRNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die lipophile Gruppe nur am Strang S1 oder nur an einem weiteren zum Strang S1 zumindest weit gehend komplementären Strang S2 der dsRNA gebunden ist.
3. DsRNA nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die lipophile Gruppe am 5'-Ende des Strangs S1 und/oder des Strangs S2, insbesondere kovalent, gebunden ist.
4. DsRNA nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die lipophile Gruppe ausschließlich am 5'-Ende des Strangs S2 gebunden ist.
5. DsRNA nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die lipophile Gruppe die Struktur eines Steroids, insbesondere eines Sterols, vorzugsweise von Cholesterin oder eines, insbesondere verzweigten, aliphatischen Kohlenwasserstoffs aufweist.
6. DsRNA nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die lipophile Gruppe die Struktur von (6-Hydroxy-hexyl)-carbamidsäure-cholesterylester oder 12-Hydroxy-dodecansäure-bis-decylamid aufweist.
7. DsRNA nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die dsRNA an ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden Ende einen aus 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2, Nukleotiden am Strang S1 gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.



8. DsRNA nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Strang S1 zwischen 16 und 30, insbesondere zwischen 16 und 25, vorzugsweise zwischen 20 und 25, Nukleotide aufweist.
- 5 9. DsRNA nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Zielgen ein, insbesondere spezifisch, in Leberzellen oder Zellen des Pankreas, der Gebärmutter oder der Harnblase exprimiertes Zielgen ist.
- 10 10. DsRNA nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Zielgen aus dem HCV-Genom, insbesondere der am 3'-Ende des HCV-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR), stammt.
- 15 11. Verfahren zur Herstellung einer dsRNA nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die den Strang S1 und/oder die den Strang S2 bildende RNA mittels Festphasensynthese in Richtung vom 3'- zum 5'-Ende hergestellt wird und dabei ein eine Phosphoramidit-Gruppe aufweisendes lipophiles Molekül (10, 17) beim letzten Synthesezyklus an das 5'-Ende der RNA gekoppelt wird.
- 20 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Synthese des die Phosphoramidit-Gruppe aufweisenden lipophilen Moleküls (10, 17) die Phosphitylierung einer freien OH-Gruppe zur Phosphoramidit-Gruppe umfasst.
- 25 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Synthese des die Phosphoramidit-Gruppe aufweisenden lipophilen Moleküls (10, 17) das Überführen von Cholesteryl-chlorformiat (8) in ein Säureamid (9) umfasst.
- 30 14. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Synthese des die Phosphoramidit-Gruppe aufweisenden lipophilen Moleküls (10, 17) das Umsetzen von

12-Hydroxylaurinsäure (11) mit Di-n-decylamin (15) unter Bildung einer Säureamidbindung umfasst.

5 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das die Phosphoramidit-Gruppe aufweisende lipophile Molekül (10, 17) [6-(2-cyanoethoxy)-N,N-diisopropylamino-phosphanyloxy]-carbamidsäure-cholesterylester (10) oder 12-[(2-cyanoethoxy)-N,N-diisopropylamino-phosphanyloxy]-dodecansäure-bis-decylamid (17) ist.

10 16. Verwendung einer dsRNA nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Hemmung der Expression eines in Zellen enthaltenen Zielgens.

15 17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass dabei kein Agens verwendet wird, durch welches die Aufnahme der dsRNA in die Zellen vermittelt wird.

20 18. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression des Zielgens in, insbesondere mit dem HCV-Virus infizierten, Leberzellen oder Zellen des Pankreas, der Gebärmutter oder der Harnblase gehemmt wird.

25 19. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Zielgen aus dem HCV-Genom, insbesondere der am 3'-Ende des HCV-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR), stammt.

30 20. Medikament zur Hemmung der Expression eines in Zellen enthaltenen Zielgens, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Medikament eine dsRNA nach einem der Ansprüche 1 bis 10 enthalten ist.

21. Medikament nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass darin kein Agens enthalten ist, durch welches die Aufnahme der dsRNA in die Zellen vermittelt wird.

22. Medikament nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen Leberzellen oder Zellen des Pankreas, der Gebärmutter oder der Harnblase sind.
- 5 23. Medikament nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Zielgen aus dem HCV-Genom, insbesondere der am 3'-Ende des HCV-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR), stammt.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine doppelsträngige Ribonukleinsäure mit einem zu einem Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Strang S1, wobei an der dsRNA mindestens eine lipophile Gruppe gebunden ist.

5

1/5

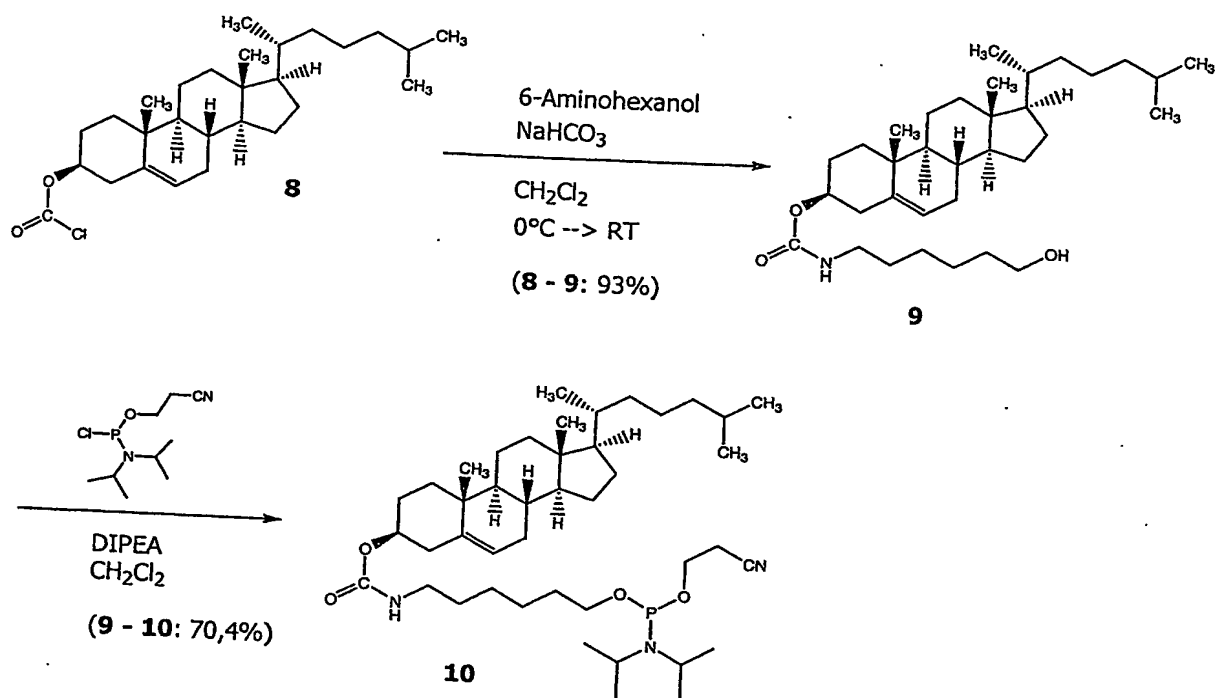


Fig. 1

2/5

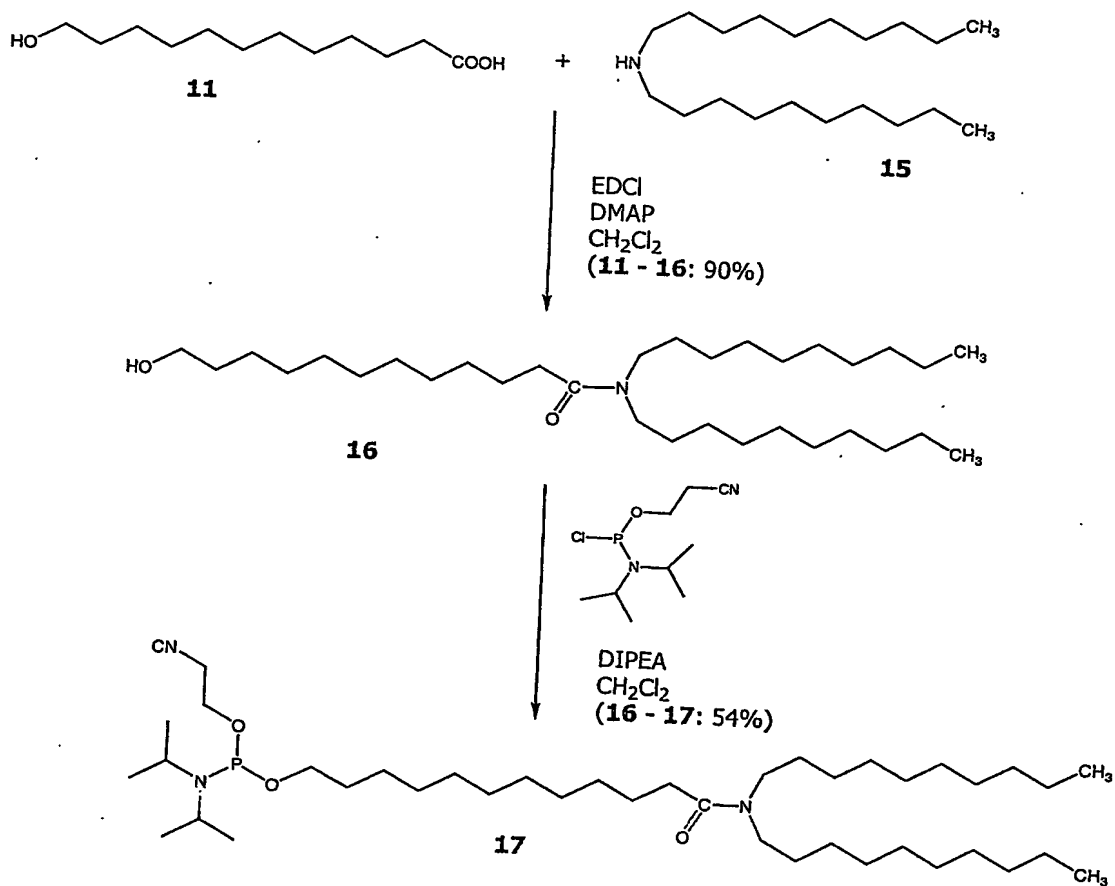


Fig. 2

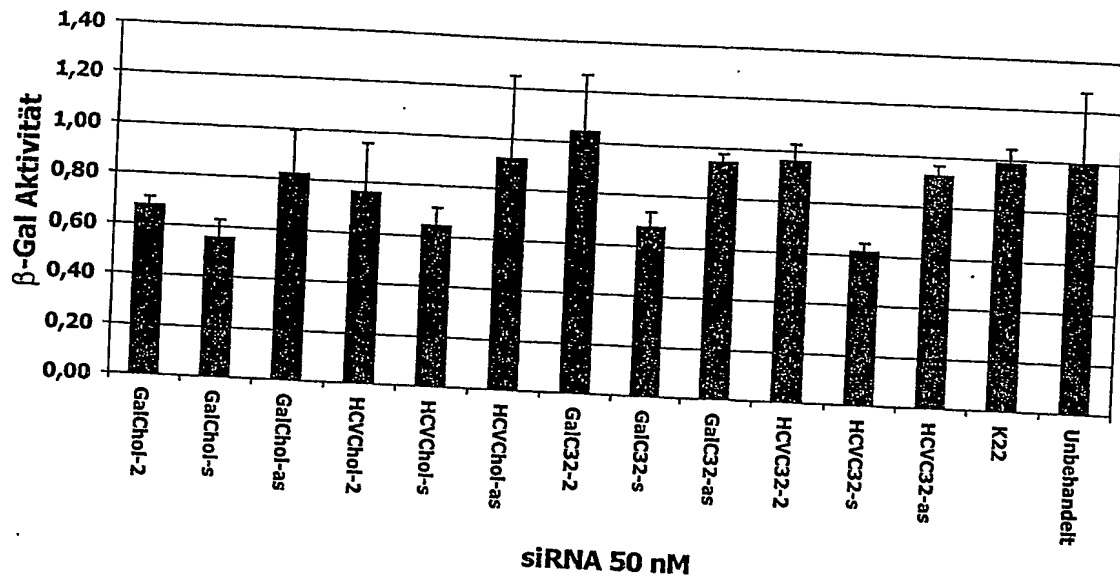


Fig. 3

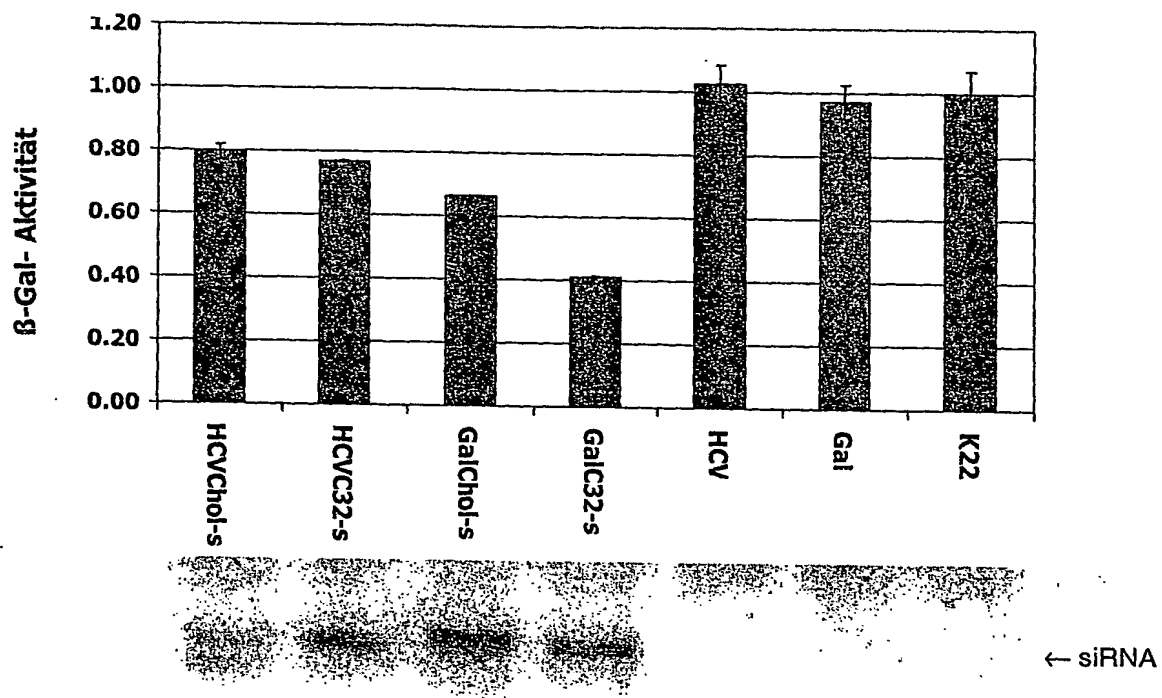


Fig. 4



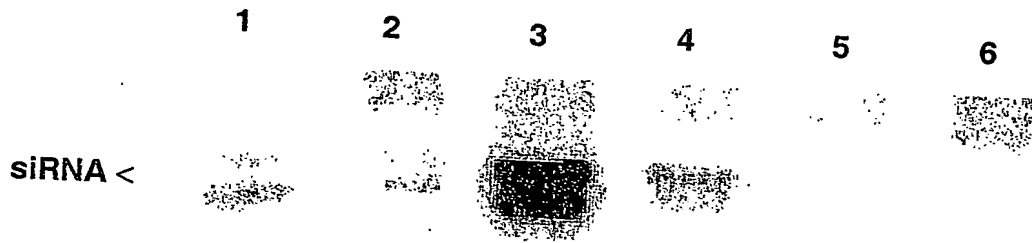


Fig. 5 a

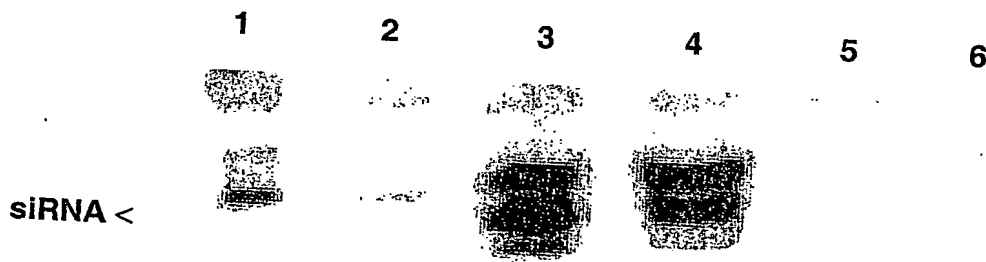


Fig. 5 b

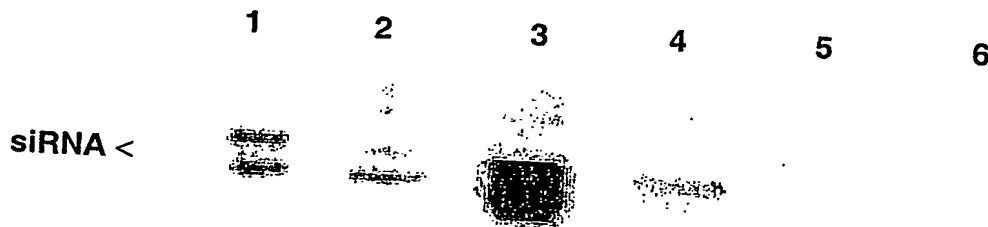


Fig. 5 c

## SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Ribopharma AG

10 <120> Doppelsträngige Ribonukleinsäure mit verbesserter Wirksamkeit

15 <130> 422517EH

20 <160> 8

<170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 23

30 <212> RNA

<213> Hepatitis C virus

35 <400> 1  
ggaccuuuca cagcuagccg uga 23

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

45 <213> Hepatitis C virus

50 <400> 2  
acggcuagcu gugaaagguc c 21

<210> 3

55 <211> 23

<212> RNA

<213> Escherichia coli

5 <400> 3  
cacgcucauc gauaauuucg ccg

23

.10 <210> 4  
<211> 21  
<212> RNA

15. <213> Escherichia coli

<400> 4  
gugaaauuau cgaugagcgu g

21

<210> 5  
25 <211> 24  
<212> RNA  
30 <213> Künstliche Sequenz

<400> 5  
35 gaugaggauc guuucgcaug auug

24

<210> 6  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> Künstliche Sequenz

45

<400> 6  
aucaugcgaa acgauccuca uccu

50

24

<210> 7  
<211> 24

55 <212> DNA

<213> Hepatitis C virus

60

<400> 7

gtcacggcta gctgtgaaag gtcc

24

5 <210> 8

<211> 57

<212> DNA

.10 <213> Künstliche Sequenz

<400> 8

15 gtcaccttgt cgtcacggct agctgtgaaa ggtccagtca ccatgtcggt tactttg

57

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**